

(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JC971 U.S. PTO
09/881748

06/18/01

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: December 7, 2000

Application Number: Japanese Patent Application
No. 372954/2000

Applicant(s): The President of the University of Tokyo

May 30, 2001

Commissioner,
Patent Office

Kozo Oikawa (seal)

Certificate No. 2001-3046706

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

JC971 U.S. PRO
09/08/48
06/18/01
06/18/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2000年12月 7日

出願番号

Application Number:

特願2000-372954

出願人

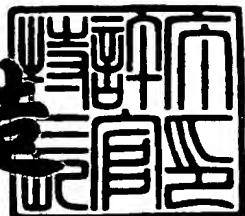
Applicant(s):

東京大学長

2001年 5月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3046706

【書類名】 特許願

【整理番号】 P00-0614

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【提出日】 平成12年12月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明の名称】 DNAメチル化パターンによる細胞の同定法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科内

【氏名】 塩田 邦郎

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科内

【氏名】 田中 智

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科内

【氏名】 大鐘 潤

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科内

【氏名】 服部 中

【特許出願人】

【識別番号】 391012327

【氏名又は名称】 東京大学長 蓮實 重彦

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 DNAメチル化パターンによる細胞の同定法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検細胞、組織又は核から単離されたDNAのメチル化パターンの情報を解析して、細胞、組織又は核を同定することを特徴とする細胞、組織又は核の同定方法。

【請求項2】 被検細胞、組織又は核から単離されたDNAのメチル化パターンの情報を、目的の細胞、組織又は核を作製するための指標として使用する方法。

【請求項3】 被検細胞、組織又は核から単離されたDNAのメチル化パターンの情報を指標として、目的の細胞、組織又は核を作製するために不可欠な遺伝子領域を特定する方法。

【請求項4】 被検細胞、組織又は核から単離されたDNAのメチル化パターンの情報を解析する手段と、得られる解析結果を指標として細胞、組織又は核を同定する手段とを含んでなる、コンピュータを細胞、組織又は核の同定システムとして機能させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNAメチル化パターンによる細胞、組織又は核の同定方法に関する

【0002】

【従来の技術】

細胞の種類を同定する場合、形態的な特徴、及び特定のタンパク質又は糖鎖などの細胞内で作られる数種類の分子が、その指標として用いられてきた。例えば、軸索上に伸びた形態を有する細胞、及び神経線維タンパク質が発現している細胞は、神経であると判断することができる。このように、従来は、正常個体から得られた組織・細胞試料を解析する場合は、形態や数種類の分子を調べるという

伝統的な手段により行われている。

【0003】

しかし、例えば培養下で、胚性幹細胞から誘導して神経細胞又は他の移植用細胞を作製することになると、移植後に期待した細胞の機能が発現しない可能性、あるいは増殖の制御をすることができない細胞になる可能性も考えられる。しかも、細胞の形態は様々な培養条件下では大きく変化することもある。従って、従来の伝統的な細胞同定法以外に精度の高い細胞同定方法の確立が望まれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、DNAのメチル化パターンを利用した細胞、組織又は核の同定法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するため銳意研究を行った結果、DNAのメチル化パターンが細胞の種類により異なる点に着目し、当該メチル化パターンの情報を解析することにより、細胞、組織又は核を同定し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、被検細胞、組織又は核から単離されたDNAのメチル化パターンの情報を解析して、細胞、組織又は核を同定することを特徴とする細胞、組織又は核の同定方法である。

【0006】

さらに、本発明は、被検細胞、組織又は核から単離されたDNAのメチル化パターンの情報を、目的の細胞、組織又は核を作製するための指標として使用する方法である。

さらに、本発明は、被検細胞、組織又は核から単離されたDNAのメチル化パターンの情報を指標として、目的の細胞、組織又は核を作製するために不可欠な遺伝子領域を特定する方法である。

【0007】

さらに、本発明は、被検細胞、組織又は核から単離されたDNAのメチル化パタ

ーンの情報を解析する手段と、得られる解析結果を指標として細胞、組織又は核を同定する手段とを含んでなる、コンピュータを細胞、組織又は核の同定システムとして機能させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体である。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】

【発明の実施の形態】

ヒトを含む哺乳類では、発生の過程でいったん分化した細胞は、細胞分裂後も親細胞と同じ性質を受け継ぎ、その性質は、通常、個体の生涯を通じて保たれる。ゲノムDNAは細胞の種類に関わり無く、すべて同じセットの遺伝情報を有しているが、発現される遺伝子のセットは細胞の種類により限定されている。本発明者は、細胞の種類に応じて特有のゲノムDNAのメチル化パターンが存在することを見出した。ゲノムDNAのメチル化は遺伝子のサイレント化と関連しているので、細胞・組織特異的なDNAメチル化パターンは、細胞の種類に固有の遺伝子発現記憶の機構として機能していることとなる。

【0009】

本発明の方法は、細胞、組織又は核（以下「細胞等」ともいう）の種類により、ゲノムDNAに現れるメチル化のパターンが異なることを利用して、そのパターン情報を解析することを特徴とする。「解析する」とは、（1）DNAのどの部分のメチル化及び/又は非メチル化がその細胞等に特異的であるかを同定すること、（2）特異的部位のメチル化の有無を検出してその細胞等の種類を同定することのいずれか一方又は両方を意味する。例えば、図1に示すように、細胞A、B及びCの3種類の細胞が存在し、ゲノムDNAのある特定の領域に8種類の遺伝子が存在していると仮定する。この領域におけるメチル化を調べた結果、細胞Aについては遺伝子1、2、5及び8がメチル化されており、細胞Bについては遺伝子1、4、5及び8がメチル化されており、細胞Cについては遺伝子1、3、6及び8がメチル化されていることが分かったとする。なお、「遺伝子X（Xは遺伝子名又は任意の番号若しくは記号を表す。）がメチル化される」とは、遺伝子Xのある特定の領域に存在する5'-CG-3'配列（以下「CpG配列」という）において、シトシ

ンの5位の炭素がメチル化されることを意味する。これらのメチル化パターンを比較すると、遺伝子1、7及び8は、メチル化のパターン（CpG配列のメチル化の有無）がいずれの細胞においても共通しており、3者を区別することはできない。しかし、細胞A～Cの範囲内では、遺伝子2のメチル化は細胞Aに特異的であり、遺伝子3及び6のメチル化は細胞Cに特異的であり、遺伝子4のメチル化は細胞Bに特異的であることがわかる。従って、細胞A～Cの範囲において、遺伝子2がメチル化されているという情報を持つ細胞は、「細胞A」であると同定することができる。さらに、遺伝子1～8のメチル化・非メチル化パターンの組み合わせ情報をあわせることでより確実な同定が可能になる。このようにして、遺伝子のメチル化は細胞により異なることを利用してメチル化情報を解析することにより、所定の細胞を同定することができる。

【0010】

また、「メチル化パターンの情報」とは、DNA上のどの配列がメチル化されているかという情報であり、DNAのメチル化パターンを検出することによりその情報を入手することができる。この場合、DNA上の配列の識別記号又は識別番号（例えば、図1において遺伝子1～8の番号）は、遺伝子がゲノム上に位置する順に付与してもよく、特定の規則性を有する限り（対比する遺伝子同士の記号又は番号が一致する限り）、ゲノム上の位置とは全く無関係に付与してもよい。

【0011】

本発明の方法の対象となるDNAは、例えば動物由来の細胞等から得られるゲノムDNAを好ましく用いることができる。なお、組織には、各種臓器を含む。例えば脳、脊髄などの神経系組織、食道、胃、小腸、大腸などの消化器、肺、気管支などの呼吸器、精巣、卵巣、子宮、胎盤などの生殖器、腎臓、膀胱などの泌尿器、骨髄、血液などの造血器等が挙げられる。また、細胞としては、例えば胚性幹細胞、栄養膜幹細胞、骨髄幹細胞、神経幹細胞等が挙げられ、上記組織からタンパク質分解酵素等で処理して得た細胞、及び培養細胞のいずれをも含む。さらに、核は、上記細胞抽出液を遠心処理し、核分画とその他の分画とを分離することにより得ることができる。

【0012】

動物由来のゲノムDNAとしては、例えばヒト、サル、イヌ、マウス、ラット、ウシ由来のものが挙げられる。

ゲノムDNAの調製は、公知の任意の方法により行うことができる (Okazaki, Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995))。例えば、組織サンプルを破碎した後、適当な細胞溶解液（タンパク質分解酵素を含む）に溶解する。得られる溶解液を例えばフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールによる抽出処理にかけてエタノール中にゲノムDNAを沈殿させる。

【0013】

上記の通り得られたDNAからメチル化を検出するための方法は特に限定されるものではなく、任意の手法を採用することができる。例えば、RLGS法、MS-PCR法、サザンプロッティング法、CpGアイランドマイクロアレイ法などにより、メチル化パターンを作製することができる。但し、本発明においては、上記方法に限定されるものではなく、メチル化情報を得るための手法であればどのような手法でもよい。以下、RLGS法、MS-PCR法、サザンプロッティング法、CpGアイランドマイクロアレイ法を例に説明する。

【0014】

(1) RLGS法

RLGS法 (Restriction Landmark Genomic Scanning法) とは、制限酵素の認識部位を目印（ランドマーク）として用い、このランドマークをシグナルとして検出する手法を意味し、広く知られた方法である。すなわち、種々の細胞又は組織からDNAを抽出し、メチル化感受性制限酵素で切断してDNA断片を作製し、標識物質（例えば³²P）で末端を標識し、1次元電気泳動でDNA断片を分離する。さらに電気泳動後のDNA断片をメチル化感受性制限酵素とは異なる他の制限酵素で消化し、2次元目の電気泳動にかけ、オートラジオグラフィー等によりスポットを解析する。そして、細胞や組織特有のスポットのパターンのデータベースを作成する。さらに、同定を目的とする細胞や、比較対照の細胞の上記スポットパターンを作成し、そのパターンを比較することで目的の細胞を同定する。本発明では、メチル化感受性を持った制限酵素を用いることで、ゲノムの数千箇所に渡る領域のメチル化状況を一度に解析することができる。

【0015】

まず、抽出したゲノムDNAを第1の制限酵素であるメチル化感受性酵素で切断する（図2(1)、(2)）。メチル化感受性酵素とは、図2(1)において「A」の位置を切断する酵素（制限酵素Aとする）である。そして、CGというジヌクレオチドのうちシトシンの5位がメチル化（修飾）されている場合は、メチル化の影響を受けてその部位を切断できなくなる酵素を意味する。

【0016】

制限酵素Aとしては、切断したときに生じる平均断片長が100kbを超える程度のもの、すなわち平均100kbを超える間隔でしか存在しない制限酵素部位を認識する制限酵素であって6~8塩基認識のものが好ましい。制限酵素Aとしては、例えばNotI、BssHII、SalI等が挙げられる。

【0017】

上記制限酵素Aによる切断部位を、標識ヌクレオチドを導入することにより標識する（図2(3)）。標識物質としては、 $[\alpha-^{32}P]dCTP$ 、 $[\alpha-^{32}P]dGTP$ 等の放射性同位体、テトラメチルローダミン-6-dUTP、フルオレセイン-12-dUTP等の蛍光色素等が挙げられ、任意に選択することができる。標識ヌクレオチドの導入は、市販のキット（例えばNew England Biolab社のSequenase ver. 2）を用いることができる。

【0018】

制限酵素Aによる切断断片をさらに短い断片にするため、制限酵素Aとは種類を異にする第2の制限酵素処理を行う（図2(4)）。第2の制限酵素は、切断したときに生じる平均断片長が数~数十kbもの、すなわち平均数~数十kbの間隔で存在する制限酵素部位を認識する制限酵素であって4~6塩基認識ものである（図2においてBの位置を切断する酵素であり、制限酵素Bとする。）。制限酵素Bとしては、例えばPvuII、Eco RV等が挙げられる。制限酵素Bによる処理を施したのち、一次元分画を行う（図2(5)）。

【0019】

分画終了後、前記制限酵素A及び制限酵素Bとは種類を異にする第3の制限酵素溶液にチューブを浸して、一次分画産物について制限酵素処理を行う。第3の制

限酵素は、制限酵素A及びBよりも切斷頻度の高い酵素であって、切斷したときに生じる平均断片長が数百bp程度の間隔で存在する制限酵素部位を認識するものである（図2において「C」の位置を切斷する酵素であり、制限酵素Cとする。）。制限酵素Cには4~6塩基認識ものを用いることができ、例えばPstI、HinfI、MboI等が挙げられる。

【0020】

制限酵素Cで断片を処理すると、制限酵素認識部位AとBとで挟まれた断片（A-B断片という）は制限酵素認識部位AとCとで挟まれた断片（A-C断片という）、及び制限酵素認識部位CとBとで挟まれた断片（B-C断片という）に切斷され、得られるDNA断片の平均鎖長はそれぞれ数百bp以下になる。これらの断片について二次元分画を行う（図2(6)）。二次元分画法としては、例えば5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動による方法等を採用することができる。

【0021】

スポットの検出は、標識物質の種類に応じた手法により行う。例えば、標識物質として³²Pを用いた場合はオートラジオグラフィーによる検出が挙げられ、蛍光色素を用いた場合は蛍光イメージアナライザー（例えばBioRad社のMolecular Imager FX装置）による検出が挙げられる。

【0022】

こうして得られた各スポットの位置を原点からX方向（1次元電気泳動の方向）、Y方向（2次元電気泳動の方向）の距離（ X_1, Y_1 ）、 (X_2, Y_2) 、… (X_n, Y_n) ）で表すと、このX座標は制限酵素Aの認識部位から制限酵素Bの認識部位まで（A-B断片）の距離を、Y座標は制限酵素Aの認識部位から制限酵素Cの認識部位まで（A-C断片）の距離を反映する。従って、これらの座標を利用してゲノム上のある特定の遺伝子に識別標識を付与し（ゲノム上に整列された順序であるとは限らない。）、そのスポットのパターンを解析することにより、試験に供した細胞がどのようなものであるか、その同定を行うことができる。但し、簡略化のため、識別標識は、座標以外に連続番号や記号で表記してもよい。

【0023】

上記のようにしてRLGS法により得られたメチル化パターンの解析は、例えば以

下の通り行うことができる。

スポットには、試験に供したどの細胞や組織でも常に出現するもの、及び細胞や組織に応じて出現するものとそうでない（出現しない）ものとが存在する。例えば、8種類の細胞について得られるスポットパターンのうち、ある特定の位置のスポットの検出を行った結果、①8種類全ての細胞についてスポットが現れる場合、及び②1～7種類の細胞についてスポットが現れる場合が生ずる。本発明では、この定常に出現するスポット（上記①の場合）は解析の対象から除外し（考慮しない）、試験した細胞によってスポットの出現が変化した箇所（上記②の場合）を選択する。次に、ある細胞等に応じて出現の仕方が異なるスポットの位置に識別番号（連続番号でも座標の表示でもよい）を付与する。

【0024】

後述の実施例に示すように、8種類の細胞等についてメチル化パターンを作製したものを例に説明する。それぞれの細胞等については約1000箇所のスポットのパターンが生じ、このうち、167箇所がスポットの出現パターンに相違が生じるため、これを解析の対象として選択し、残りのスポットは8種類の細胞及び組織の全てに出現するため解析の対象から除外する。ただし、特異的に検出されるスポットの位置を同定するためのマーカーとなる。なお、図5に示すスポットはC57BL/6マウスの腎臓由来のDNAのメチル化パターンであり、このパターン上に、上記167箇所の位置を○印で付した。他の7種類の細胞等についても同様である。

【0025】

予め任意の細胞等について作製されたパターン上に識別番号を付した位置のスポットの有無と、試験した細胞等について作製されたパターン上に上記と同じ識別番号を付した位置のスポットの有無とを検出・比較し、その組織又は細胞に特有のスポットであるか否かを判断する。ここで、各識別番号を付した位置のスポットの有無を図5に示すように模式的に示しておくと、スポットが、調べた組織又は細胞に特有であるか否かを判断することができる。例えば、79番の位置に出現したスポットは8種類のサンプルのうち胚性幹細胞（未分化）のみであるので、79番の位置に出現するスポットを得た細胞は胚性幹細胞（未分化）であると同定することができる。換言すれば、胚性幹細胞（未分化）は、79番の位置にス

ットが出現するといえる。

【0026】

但し、試験した特定の細胞等に特有の1個のスポットのみを解析すべきスポットとして選択する必要はなく、複数のスポットの組み合わせによって細胞等を同定することが可能である。例えば、図5において、79番及び80番のスポットに着目すると、79番及び80番の両者にスポットが生じた場合は胚性幹細胞の未分化型であると同定することができ、79番はスポットが生じないが80番はスポットが生じた場合は胚性幹細胞の分化型であると同定することができる。スポットの組み合わせが2個、3個又はそれ以上であっても同様である。サンプル数は上記例示の8種類の細胞等に限定されるものではなく、その種類をさらに増加させることにより、より詳細に細胞等を同定することができる。すなわち、ある一定数の種類において特異的であることが分かっても、試験する細胞等の種類を増加するとその細胞等に特異的でないことが判明する場合もあり得る。従って、メチル化パターンが特異的であるか否かは、できるだけサンプルの数を増やして解析するか、あるいは同定目的に応じて試験すべきサンプルを限定又は選択し、その範囲内で解析することが好ましい。

【0027】

得られたスポットが、ある組織又は細胞に特有なものである場合は、そのスポットはある組織又は細胞由来の情報源となる（スポットの位置、濃淡等）。そこで、このようなスポットの有無（例えば図5の模式図の情報）をデータベースとして蓄積しておく。データベースの構築は、コンピュータ解析することができるよう、それぞれの情報をデジタル化することにより行う。例えば、位置のデジタル化は座標又は識別番号により、スポットの濃淡のデジタル化は、スポット強度を定量することにより行われる。

【0028】

これらのデータを蓄積しておくことにより、種類や由来が不明な細胞であっても、その細胞について得られたスポットのパターンをデータベースと比較することで、その種類を特定することができる。スポットのパターンをデータベースと比較するには、細胞等同定処理用のコンピュータプログラムにより行うこと

ができる。そして、細胞等をいくつかのカテゴリーに分類しておくことにより、系統的な同定をすることが可能である。

【0029】

(2) MS-PCR法

PCR法においては、特定のゲノム上の遺伝子が増幅されるように特異的プライマーを設計及び合成し、これらのプライマーを用いて当該遺伝子を鑄型としてPCRを行う。増幅前にゲノムDNA中の遺伝子領域をメチル化感受性制限酵素で切断すると、メチル化されている遺伝子は切断されず、メチル化されない遺伝子は切断されることとなる。これらの遺伝子をPCR法により増幅し、増幅された断片を電気泳動により分離し、バンドの態様を調べる。このとき、メチル化されていたものではバンドが観察され、メチル化されていなかったものではバンドが観察されないことをを利用して、試験した遺伝子はメチル化されているか否かを知ることができる。

【0030】

例えば、図1において、細胞Aの遺伝子1のメチル化を調べる場合は、まず、遺伝子1がPCRにより増幅されるように特異的プライマーを設計する。特異的プライマー（フォワード及びリバースプライマー）は、遺伝子1上の任意の領域から選択することもでき、遺伝子1の5'側に隣接する領域及び3'側に隣接する領域から選択することもできる。プライマーのヌクレオチド数は10～35、好ましくは20～30であり、増幅断片が100～1000bp、好ましくは200～500bpとなるようにプライマーを設計する。また、プライマーは、増幅断片中にメチル化感受性酵素の認識部位が含まれるように設計する。増幅すべき遺伝子の塩基配列が不明の場合は、市販の自動塩基配列決定装置（例えばPERKIN-ELMER社製373A DNAシーケンサー等）により塩基配列を決定することができる。

【0031】

PCRは任意の装置（例えばStratagene社のRobocycler等）を用い、適当なサイクル条件を適宜設定する。PCR後は、メチル化感受性酵素で処理し、アガロースゲル電気泳動等に付してバンドを調べる。

【0032】

(3) サザンブロッティング (Southern blotting) 法

ゲノムDNAをメチル化感受性制限酵素で切断すると、メチル化されている制限酵素部位は切断されず、メチル化されていない制限酵素部位は切断される。切断したゲノムDNAをアガロース電気泳動により分離し、DNA断片をナイロン膜に転写し、³²P標識した遺伝子に特異的なプローブをハイブリダイズさせることで、プローブとして用いた遺伝子のメチル化の有無を、検出されるバンドの長さの違いとして検出することが出来る。

【0033】

(4) CpGアイランドアレイ法

ゲノムDNAをメチル化されうる配列を含まない制限酵素により切断した後に、PCR用のプライマー部位を含んだリンカーを接続する。リンカーを接続したゲノムDNA断片をメチル化感受性制限酵素で切断した後にリンカー中のプライマーを用いてPCR法により増幅する。このとき、メチル化されていないものはメチル化感受性制限酵素によりプライマー間で切断されて増幅されず、メチル化されていたもののみが増幅されることになる。そこで、任意の2つの組織や細胞どうしで同様のPCR反応を行うとそれぞれに特異的なメチル化領域の存在により増幅される遺伝子の種類に差が出来ることになる。それらをサブトラクション法によりメチル化に差のあったもののみを選別してプローブとする。これらのプローブを遺伝子ライブラリーとハイブリダイズさせて、塩基配列を確認して遺伝子を同定することが出来る。

【0034】

2. 遺伝子領域の特定、及び細胞等を製造するための指標としての使用

本発明においては、DNAのメチル化パターンの情報は、目的の細胞、組織又は核を作製するための指標として使用することができる。すなわち、細胞の種類によりメチル化パターンが異なることを利用して、目的の細胞、組織又は核を作製するために不可欠な領域を特定することができる。

【0035】

例えば、図1において、メチル化パターンの解析により、細胞Aと細胞Bとは同じ胚幹細胞（ES細胞）であるが、遺伝子2がメチル化され、遺伝子4が脱メチル

化されている場合（細胞A）は分化型ES細胞、遺伝子2が脱メチル化され、遺伝子4がメチル化されている場合（細胞B）場合は未分化型ES細胞に分類されることが判明したものと仮定する。この場合は、目的の細胞（すなわちES細胞）を作製するために不可欠な遺伝子領域は、遺伝子2及び4である。組織を製造する場合及び核を製造する場合でも、不可欠な遺伝子領域の特定方法は細胞の場合と同様である。

【0036】

遺伝子のメチル化は、DNAをメチル基転移酵素（例えばSss I、Hpa II methylese）で処理することにより行われる。一旦分化した細胞では、シトシンのメチル化は細胞分裂に先立つDNA複製時（S期）に、DNAメチル基転移酵素によって親鎖DNAのメチル化シトシンを認識し、娘鎖DNAをメチル化することで、新たな細胞にメチル化パターンが受け継がれる。

【0037】

従って、分化型のES細胞の製造を目的とする場合は、細胞Bの遺伝子をランダムにメチル化して培養すればよい。培養は、一般に使用されているRPMI1640培地、DMEM培地、MEM培地、又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いて、一般的動物細胞培養手法に準じて行うことができる。その後、脱メチル化処理を行ってランダムにメチル化をはずした後に、前記と同様にメチル化パターンの情報を解析して、その結果を指標として細胞Bの遺伝子2がメチル化され、遺伝子4が脱メチル化されている細胞、組織又は核をスクリーニングして単離することにより、目的の細胞等を得ることができる。

【0038】

本発明において、目的の細胞としては特に限定されるものではないが、例えば胚性幹細胞、栄養膜幹細胞、骨髄幹細胞、神経幹細胞等が有用性の高い細胞として挙げられる。

また、目的の組織は特に限定されるものではなく、例えば脳、脊髄などの神経系組織、食道、胃、小腸、大腸などの消化器、肺、気管支などの呼吸器、精巣、卵巣、子宮、胎盤などの生殖器、腎臓、膀胱などの泌尿器、骨髄、血液などの造血器等が挙げられる。目的の組織を製造する方法は、体外培養下で、適切な細胞

数（培地25mlあたり 10^6 から 10^7 個、好ましくは 6×10^6 から 10^7 個）まで培養した後、通常の組織培養を行って組織に再生させる方法等が採用される。

【0039】

本発明の方法は、目的の部位のみにメチル化を入れたり（メチル化）、又ははずしたり（脱メチル化）、あるいは自由に幹細胞が作れるようになったときにおいても、幹細胞であるかどうかあるいは幹細胞の度合いを評価することで、例えば生体移植などへの安全性の評価や効率の向上に寄与することができる。

【0040】

3. 細胞同定システム

本発明の同定システムは、

- (a) 被検細胞から単離されたDNAのメチル化パターンの情報を解析する手段と
- 、(b) 得られる解析結果を指標として細胞を同定する手段とを含む。

【0041】

上記(a)の解析手段は、ある一のゲノムDNAのメチル化パターン及び他のゲノムDNAのメチル化パターンをそれぞれ検出する手段（「検出エンジン」ともいう）、並びに得られる検出値を比較する手段（「比較エンジン」ともいう）により構成される。

上記(b)の同定手段は、上記比較結果を指標として前記一のDNAと他のDNAとの同一性を求める手段（「同一性作成エンジン」ともいう）により構成される。

【0042】

(1) DNAメチル化パターンの検出エンジン

本発明において、DNAメチル化パターンの検出は、前記の通り得られたパターンをデジタル化し、そのデジタル情報を使用又は適用することにより行うことができる。

【0043】

(2) 比較エンジン

比較エンジンでは、(i)ある野生型の細胞等のDNAメチル化パターンの情報と、(ii)ある変異型の細胞等のDNAメチル化パターンの情報、又は特定の細胞等のDNAメチル化パターンの情報と、(iii)同定の対象となる細胞等のDNAメチル化パター

ンの情報を蓄積する。

【0044】

(3) 細胞同定エンジン

細胞等同定エンジンは、比較エンジンにより得られたデータ（スポット又はバンドが出現する位置の違い、スポット又はバンドの濃さの違い等）に基づいて、ある細胞等と他の細胞等との同一性を導く手段である。この手段は、例えば細胞Aと細胞Bとの同一性を調べる場合において、細胞AのDNAメチル化パターンの情報が、細胞BのDNAメチル化パターンの情報と比較してどの程度変化したときに、その細胞Aは細胞Bに対して同一なのか、異なるのか、という判断を実行する手段である。

【0045】

ここで、本発明の同定システムの構成例を示すブロック図を示す（図6）。

図6に示す同定システムは、CPU601、ROM602、RAM603、入力部604、送信/受信部605、出力部606、ハードディスクドライブ(HDD)607及びCD-ROMドライブ608を備える。

【0046】

CPU601は、ROM602、RAM603又はHDD607に記憶されているプログラムに従って、細胞等同定システム全体を制御し、後述する同定処理を実行する。ROM602は、細胞等同定システムの動作に必要な処理を命令するプログラム等を格納する。RAM603は、細胞等同定処理を実行する上で必要なデータを一時的に格納する。入力部604は、キーボードやマウス等であり、細胞等同定処理を実行する上で必要な条件を入力するとき等に操作される。送信/受信部605は、CPU601の命令に基づいて、通信回線を介してデータベース610等との間でデータの送受信処理を実行する。出力部606は、入力部604から入力された各種条件、スポット又はバンドの位置又は座標、バンド又はスポットの濃淡データ等を、CPU601からの命令に基づいて表示処理を実行する。なお、出力部606としては、コンピュータのディスプレイ又はプリンターなどが例示される。HDD607は、細胞若しくは組織同定プログラム又はバンド若しくはスポット等のメチル化パターン情報を格納し、CPU601の命令に基づいて、格納しているプログラム又はデータ等を読み出し、例えばRAM603

に格納する。CD-ROMドライブ608は、CPU601の指示に基づいて、CD-ROM609に格納されている細胞等同定プログラムから、プログラム又はデータ等を読み出し、例えばRAM603に格納する。

【0047】

CPU601は、入力部などから受け取ったデータを出力部606に供給するとともに、データベースから受け取ったデータに基づいて細胞等同定処理を実行する。データベースとは、前記の通り得られたスポットをデジタル化し、そのデジタル情報を蓄積したものをいう。

【0048】

図7は、RLGS法によりメチル化パターンを解析した場合において、図6に示すプログラムによる細胞同定処理を行ったときの例を示すフローチャートである。実施例に示すように、スポットのパターンが図3のようになら得られ、このうち167箇所(○で囲んだ箇所)を設定する。これを各細胞等について行い、スポットの有無を模式的に図5のよう示したとする。図5に示すデータを例として、細胞等同定処理例を示す。

【0049】

まず、RLGS法により得られたスポットのパターンデータを入力する(ステップ1(S1))。データ入力が確定するまでは、ステップ1及びステップ2を繰り返す。なお、データの入力により、それぞれの組織又は細胞から得られた情報(図5に示すデータ)は、データベースに登録されるものとする。また、スポットの強弱のデータは、図5に示すような「●」、「◎」、「○」、「-」等の記号でもよく、0、1、3、5等の数値でもよい。

【0050】

データの確定後、79番にスポットが強く現れたか否かを判断する(ステップS3)。スポットが強いと判断した場合(Yes)は、対象となった組織又は細胞は胚性幹細胞(未分化型)であると決定する(ステップS4)。スポットがないと判断した場合(No)は、次に、160番又は161番にスポットが強く現れたか否かを判断する(ステップS5)。スポットが強いと判断した場合は、対象となった組織又は細胞は胚性幹細胞(分化型)であると決定する(ステップS6)。160番又は161番の

スポットが生じないと判断された場合は、次に、98番にスポットが強く現れたか否かを判断する（ステップS7）。スポットが強いと判断した場合は、対象となつた組織又は細胞は栄養膜細胞（未分化型）であると決定する（ステップS8）。スポットがないと判断した場合は、次に、12番にスポットが強く現れ、かつ、13番にスポットが現れないかどうかを判断する（ステップS9）。12番にスポットが強く現れ、かつ、13番にスポットが現れなかつたと判断した場合は、対象となつた組織又は細胞は栄養膜細胞（分化型）であると決定する（ステップS10）。上記以外のスポットのパターン（12番が○であり、かつ、13番が○又は●である）の場合は、次に、149番にスポットが強く現れたか否かを判断する（ステップS11）。149番にスポットが強く現れたと判断した場合は、対象となつた組織又は細胞は腎臓であると決定する（ステップS12）。149番にスポットが現れなかつたと判断した場合は、49番、52番、60番又は61番にスポットが強く現れたか否かを判断する（ステップS13）。49番、52番、60番又は61番のスポットのいずれかが強く現れたと判断した場合は、対象となつた組織又は細胞は胎盤であると決定する（ステップS14）。49番、52番、60番及び61番のスポットのいずれも現れなかつたと判断した場合は、44番にスポットが強く現れたか否かを判断する（ステップS15）。44番にスポットが強く現れたと判断した場合は、対象となつた組織又は細胞は脳であると決定する（ステップS16）。44番にスポットが現れなかつたと判断した場合は、30番、31番、32番、33番、62番、65番及び66番のいずれかのスポットが強く現れたか否かを判断する（ステップS17）。30番、31番、32番、33番、62番、65番及び66番のいずれかのスポットが強く現れたと判断した場合は、対象となつた組織又は細胞は精子であると決定する（ステップS18）。30番、31番、32番、33番、62番、65番及び66番の少なくとも1つにスポットが現れなかつたと判断した場合は、同定操作は終了する（ステップS20）。各細胞等の同定がなされた段階においても、同定操作は終了する（ステップS19）。

【0051】

上記例示した細胞等とは別の細胞等についても、図5と同様のパターンの模式図を作成し、図7に示すフローチャートと同様のプログラムに従って、同定操作を行うことができる。

【0052】

本発明の細胞同定方法においては、既に決定された各細胞等のDNAメチル化パターンと、同定の対象となる細胞等のDNAメチル化パターンとを関連付けておくことが重要である。すなわち、既に決定された各細胞等のDNAメチル化パターンの情報に基づいて、同定の対象となる細胞等の情報を決定することが重要である。そこで、既に決定された各細胞等のDNAメチル化パターンの情報と、被検細胞等について得られたDNAメチル化パターンの情報を記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を使用するのが好ましい。この記録媒体には、コンピュータを、上記検出されたメチル化パターンを比較する手段と、その比較結果を指標として、細胞を決定する決定器として機能させるためのプログラムが記録されていてもよい。このプログラムは、別の記録媒体に記録されていてもよい。記録媒体には、CD-ROM、ハードディスク、ROM、RAM等が含まれる。

【0053】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例1〕 RLGS法によるメチル化パターンの解析

本実施例では、RLGS法を一例として用いてメチル化パターンの解析を行った。

【0054】

(1) ゲノムDNAの調製

ゲノムDNAは、公知方法に従って以下の通り調製した。

それぞれの凍結した組織サンプル (0.5-1g) を破碎し、25mlの溶解バッファー (150mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH8.0, 1% SDS) (プロテイナーゼK (10mg/ml:Mer k) を含有)に溶解した。混合物を55°Cで20分インキュベートした。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (50:49:1) による抽出を2回行い、エタノール中にゲノムDNAを沈殿させ、200μlのTE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH7.6) に溶解した。

【0055】

(2) RLGS法

シトシンの5'のメチル化は、哺乳類のゲノムDNAで唯一見られる化学修飾である。マウスの数種類の細胞（胚性幹細胞、栄養膜幹細胞、精子）又は組織（胎盤、腎臓、脳）を用いてDNAメチル化状況を解析した。

【0056】

RLGSは、公知の方法に準じて行った (Okazaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:5610-5614, 1995)。7 μ lのTE中3.5 μ gのゲノムDNAを、0.4 μ M dGTPs、0.2 μ M dCTP(Amersham)、0.4 μ M ddATP及び0.4 μ M ddTTPの存在下で 10unitのクレノウ断片 (TOYOBO) で処理した。得られたDNAをまずランドマーク制限酵素として20unitのNotI又はBssHIIで処理し、0.33 μ M [α -³²P] dCTP及び0.33 μ M [α -³²P] dGTP (Amersham) の存在下、1.3unitsのSequenase Ver.2.0(USB Co., Lt d.)を用いて5'突出末端を放射標識した。標識DNA (1.5 μ g) を20unitsのPvuII (TaKaRa) で処理した後、1次元電気泳動を行った (0.9%アガロースディスクゲル、約23時間、230V)。次に、ゲル中のDNA断片を1000unitsのPstI (TaKaRa) で処理した。2次元電気泳動は、150Vで20時間行った。電気泳動終了後、ゲルを乾燥させ、-80°Cで7~10日間X線フィルム (Kodak XAR5) に感光させた。

【0057】

その結果、約1,000のRLGSスポットが検出され (図3)、細胞や組織の種類に関係なく、常に検出されるスポットが約85%存在した。細胞の種類により検出されるスポットのパターンが異なる箇所に番号をつけ (番号1~167、図3)、これらのスポットから抽出したいくつのスポットの検出例を図4に示した。図4において、#79は胚性幹細胞に特異的であり、他の組織では検出されない。同様に#98は栄養膜幹細胞に特異的である。#91は胎盤又は栄養膜細胞系列に特異的である。#99は脳と分化栄養膜細胞に認められる。#30は精子に特異的なスポットである。一方、#27は他の細胞・組織では認められるが、精子では認められない。このようにして、異なった細胞間又は組織間で検出されるか否かを示したRLGSスポットに番号をつけ、167個の違いが見つかった。

【0058】

上記167個のスポットについて、細胞・組織特異的メチル化パターンの模式図を図5に示した。この解析例より、パターンの単独又はそれらの組み合わせによ

り、組織・細胞特異的にメチル化又は非メチル化されている領域（少なくとも167領域）が存在することを示している。このことは逆に、未知の細胞でも、メチル化パターンを解析することで、細胞や組織の種類を特定することが可能であることを示している。

【0059】

【実施例2】 遺伝子領域の特定

実施例1(1)に準じてゲノムDNAを抽出することにより得られたラットの胎盤、脳、腎臓の遺伝子領域のメチル化状態の差異を検出した結果、1033遺伝子中24の遺伝子にメチル化パターンの差が見られた。

【0060】

メチル化パターンの差が検出された遺伝子を単離し、塩基配列を既知のデータベースで検索したところ、胎盤特異的脱メチル化遺伝子としてクエン酸トランスポーター(C3TP)・エストロジエン硫酸基転移酵素(STE)が、脳特異的遺伝子として、スフィンゴ脂質リン酸化酵素(SPHK)・Frizzledがそれぞれ同定された。

【0061】

【発明の効果】

本発明により、DNAのメチル化パターンを利用した細胞等の同定方法が提供される。本発明の方法によれば、特徴が十分に明らかにされていない未知の細胞であっても細胞の種類を特定することができ、有用な細胞株の開発・樹立に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の方法の概要を示す図である。

【図2】

RLGS法の概要を示す図である。

【図3】

メチル化パターンを示す写真である。

【図4】

メチル化パターンを示す写真である。

【図5】

メチル化パターンの模式図である。

【図6】

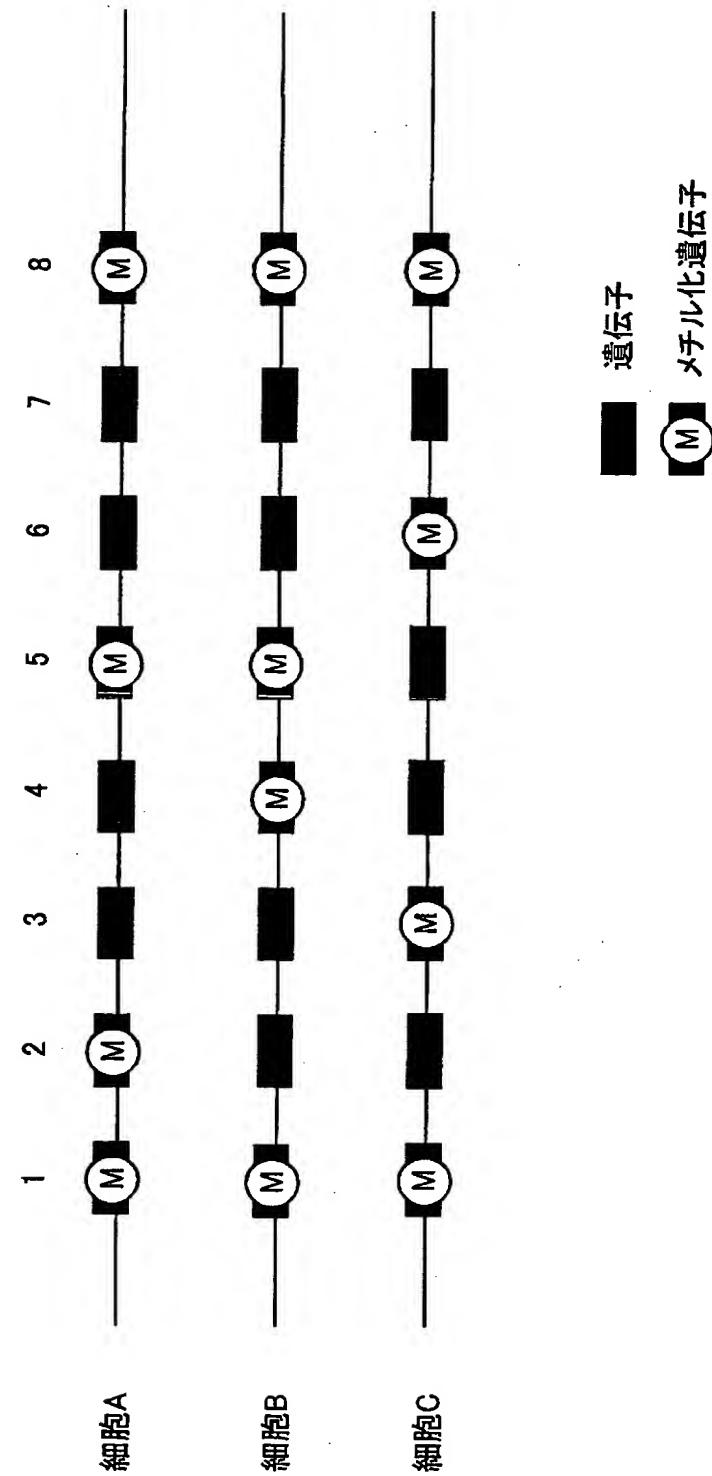
細胞等同定システムのブロック図である。

【図7】

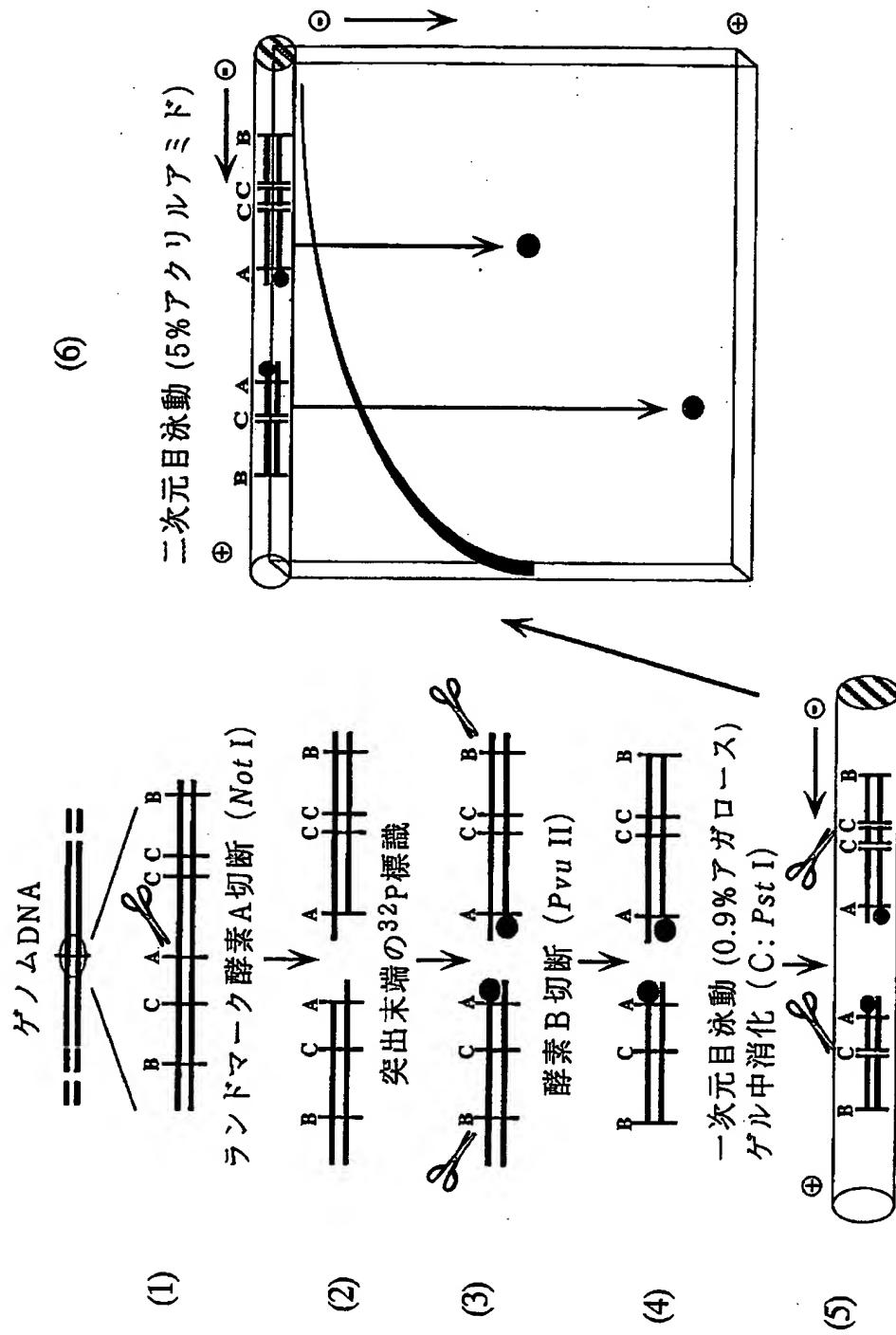
細胞等同定プログラムによる処理例を示すフローチャートの図である。

【書類名】 図面

【図1】

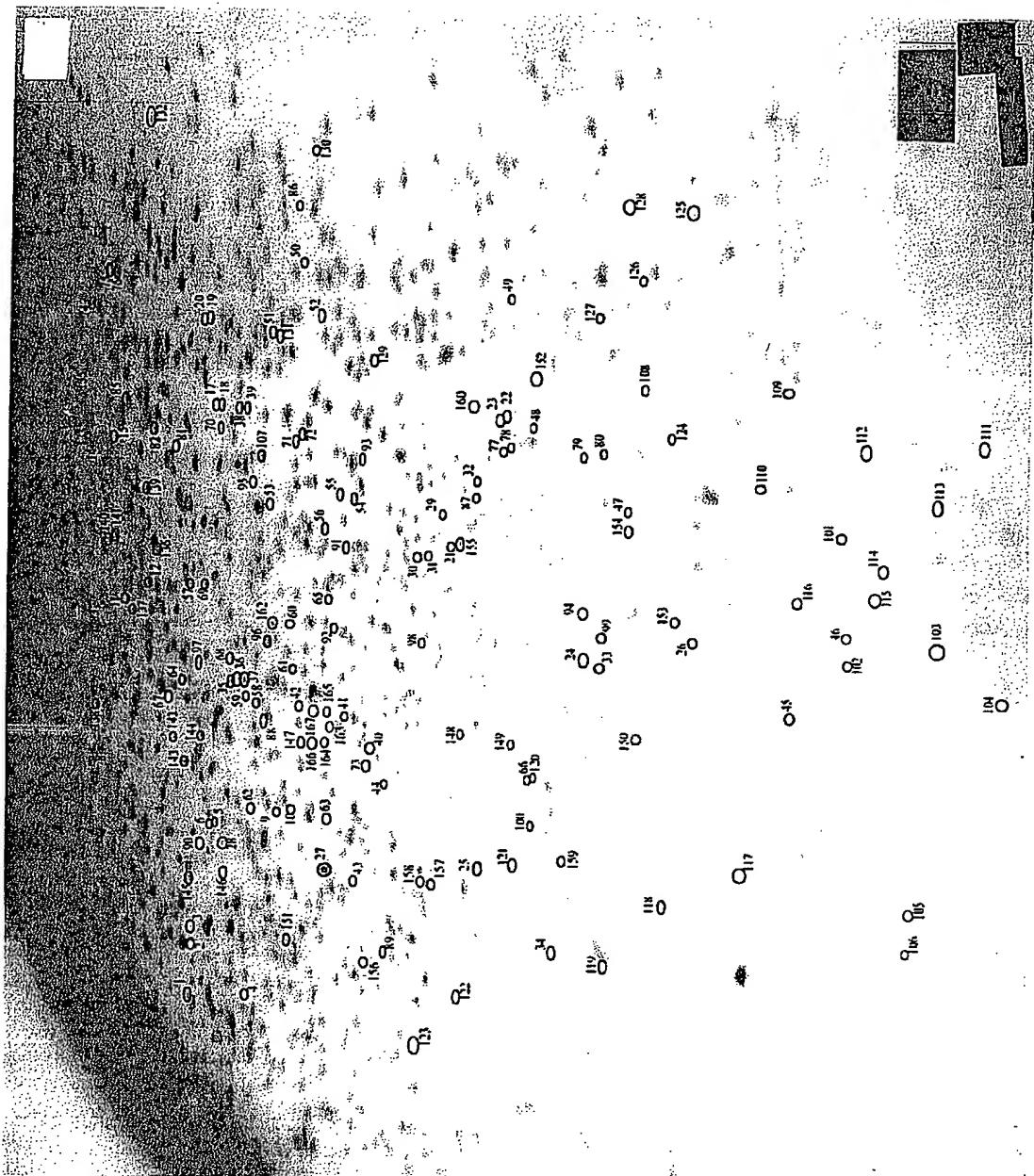


【図2】

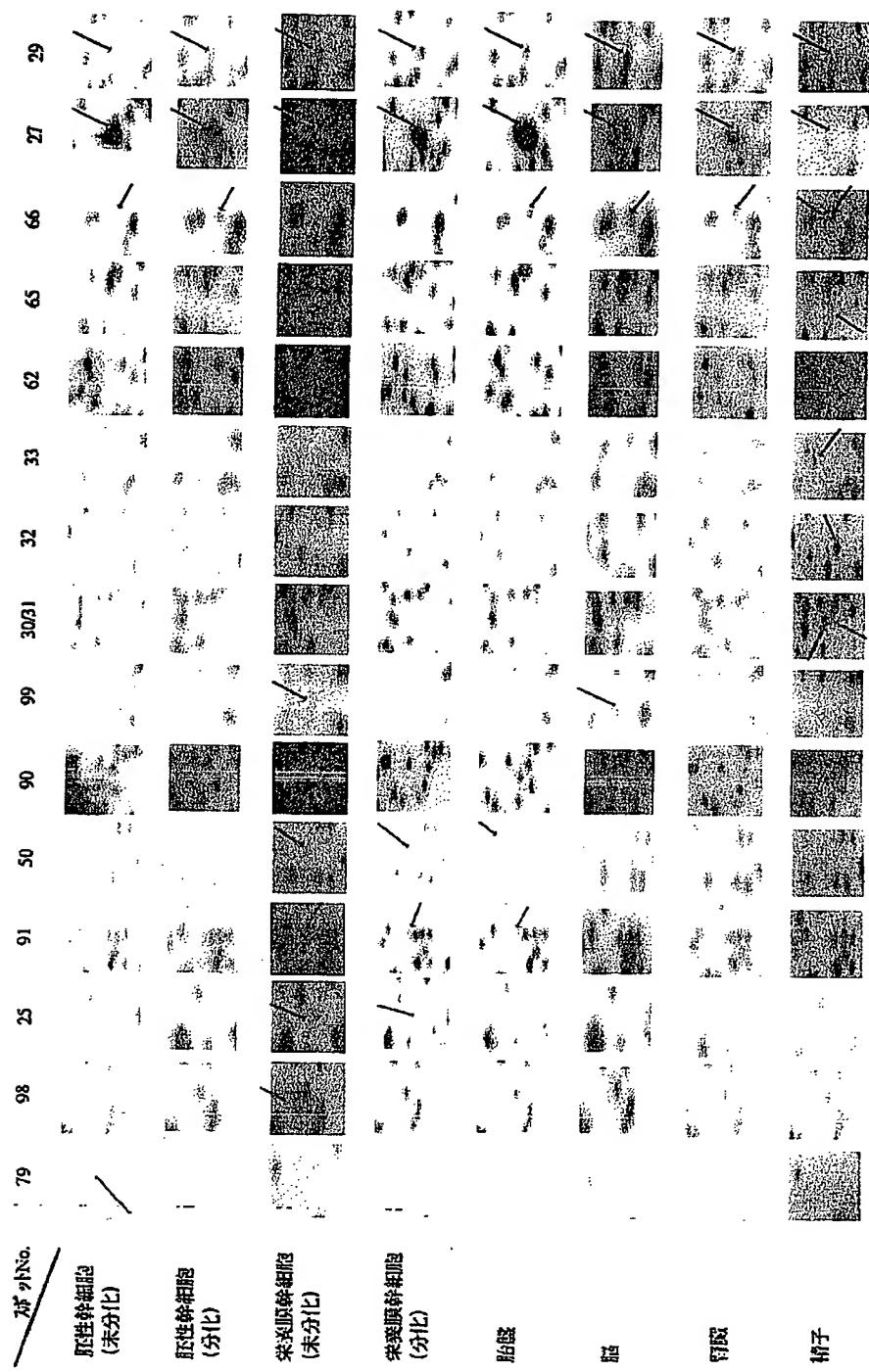


特2000-372954

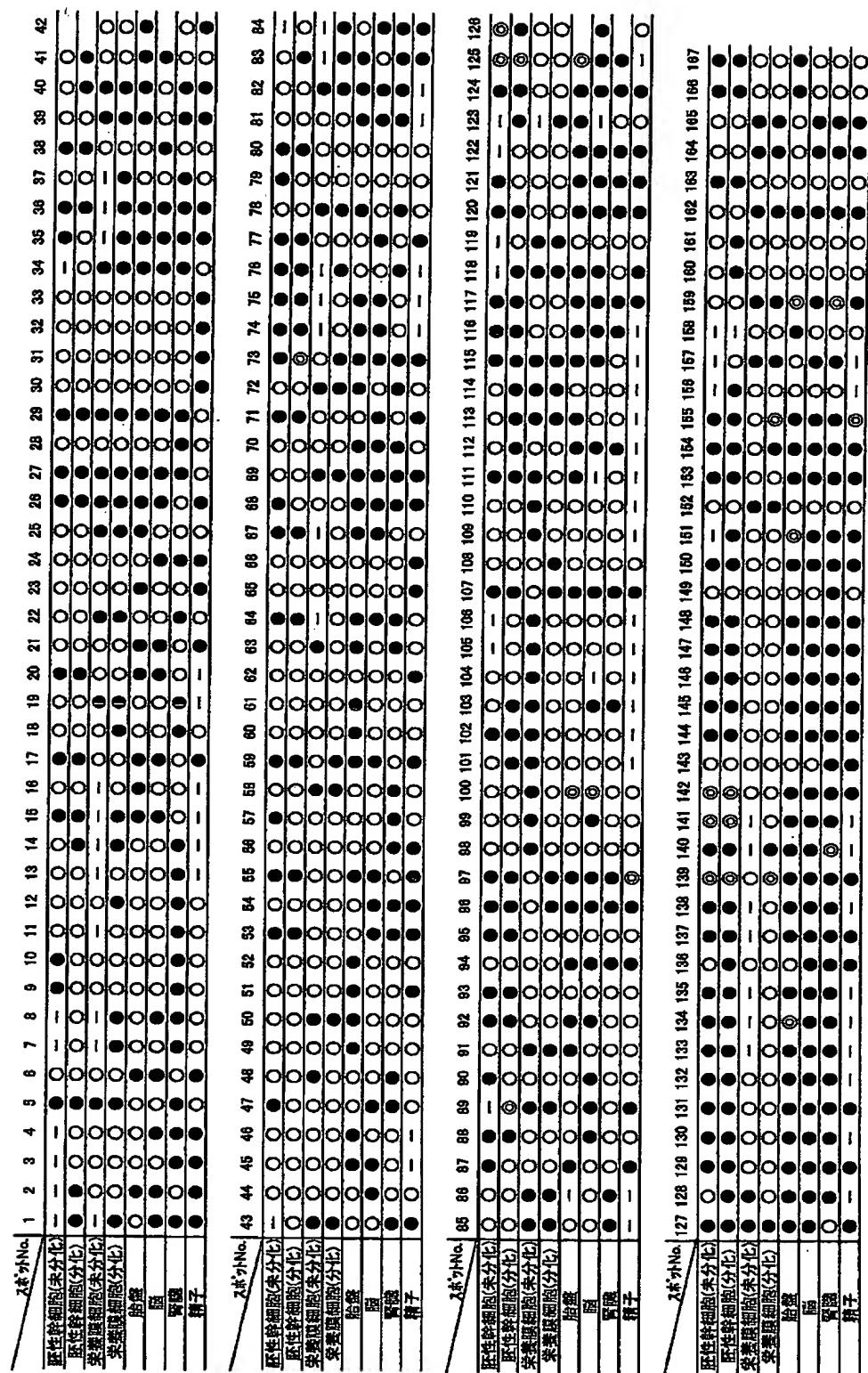
【図3】



【図4】

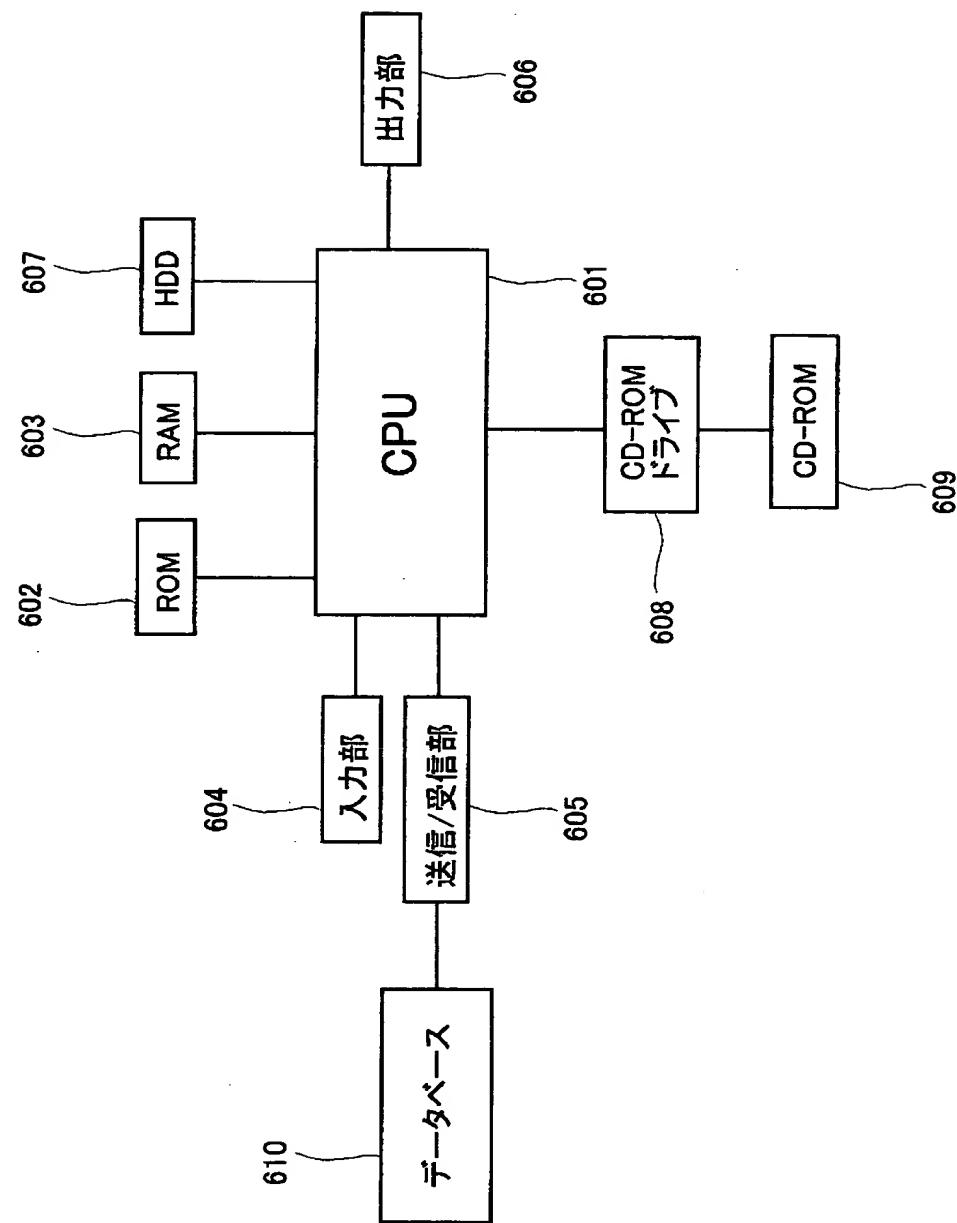


【図5】

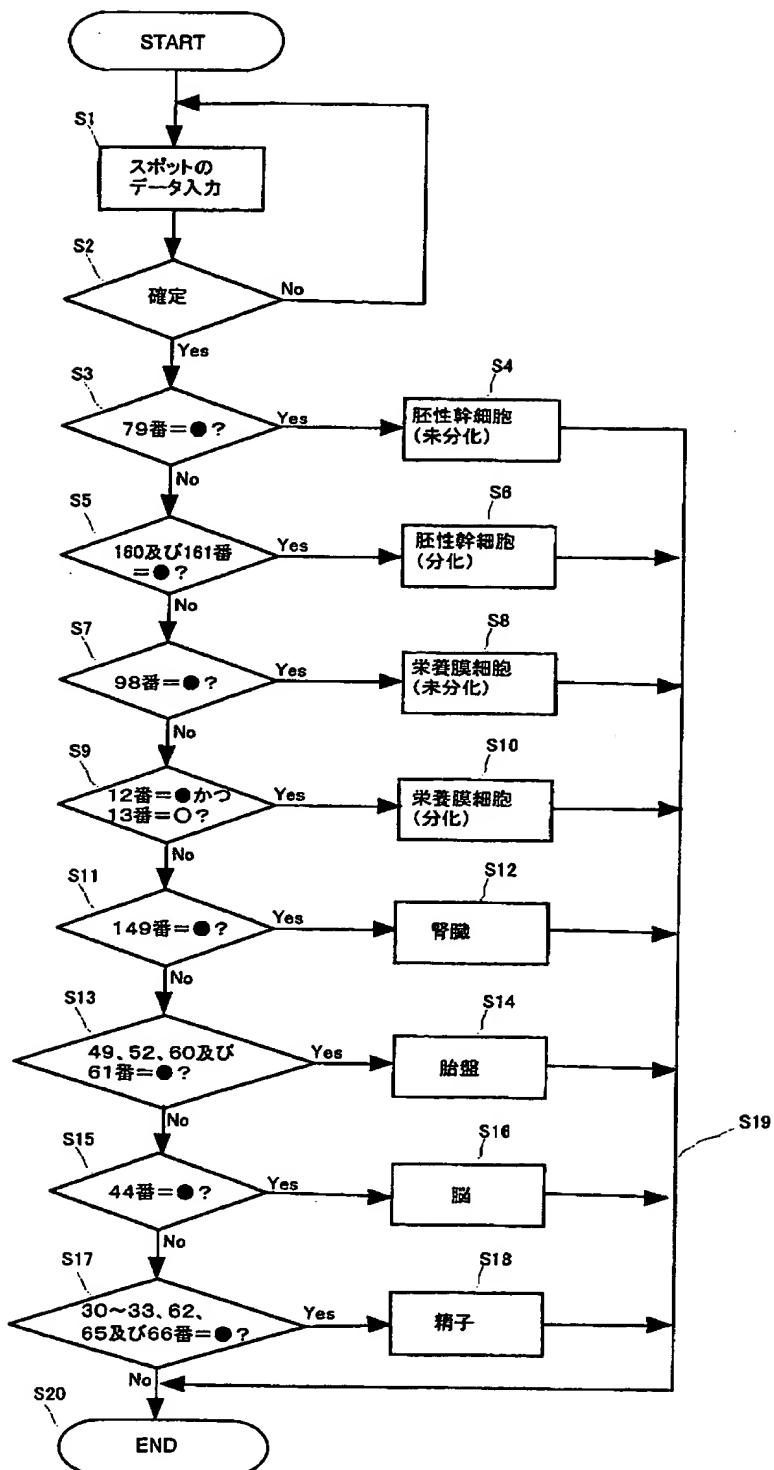


●' = 有、'◎' = 疑、'○' = 無、'-' = 判別不能

【図6】



【図7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞等の同定方法の提供。

【解決手段】 被検細胞、組織又は核から単離されたDNAのメチル化パターンの情報を解析して細胞を同定することを特徴とする細胞、組織又は核の同定方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-372954
受付番号	50001580172
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成13年 2月 1日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	391012327
【住所又は居所】	東京都文京区本郷7丁目3番1号
【氏名又は名称】	東京大学長

【代理人】

【識別番号】	100091096
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森 ビル3階平木国際特許事務所
【氏名又は名称】	平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】	100096183
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森 ビル3階平木国際特許事務所
【氏名又は名称】	石井 貞次

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [391012327]

1. 変更年月日 1991年 1月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都文京区本郷7丁目3番1号
氏 名 東京大学長